

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/29

A61P 1/16

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01112958.1

[43] 公开日 2001 年 12 月 5 日

[11] 公开号 CN 1324661A

[22] 申请日 2001.5.23 [21] 申请号 01112958.1

[71] 申请人 中国人民解放军第二军医大学

地址 200433 上海市翔殷路 800 号

[72] 发明人 孙树汉 戴建新 胡振林 周凤娟

[74] 专利代理机构 中国人民解放军第二军医大学专利事务所

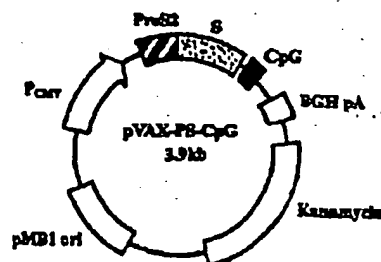
代理人 丁振英

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图页数 5 页

[54] 发明名称 一种人乙型肝炎核酸疫苗

[57] 摘要

本发明涉及医药生物技术领域,是一种人乙型肝炎核酸疫苗。它是由人乙型肝炎 *adr* 亚型表面抗原基因 *preS2-S* 组成的转录表达单元与人体特异免疫激活序列(CpG 序列:20062103)共同组成的真核生物表达质粒 pVAX-PS-CpG。动物实验结果表明,本发明对人乙型肝炎患者可能不但具有良好的免疫保护作用,而且具有治疗作用。本核酸疫苗的生产纯化工艺简单,理化性质稳定,便于储存和运输。



ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

## 权利要求书

1、一种人乙型肝炎核酸疫苗，以真核表达载体为基本骨架，含有乙型肝炎的表面抗原基因和免疫激活序列 CpG，其特征在于乙型肝炎表面抗原基因为 adr 亚型乙肝表面抗原基因 preS2-S，其核苷酸序列为：

```
atgcagtgga actccaccac atttcacca gtcctgctag atcccagagt gaggggccta
tattttecto ctggtggctc cagttccgga acagtaaaco ctgttgcgac tactgcctca
cccatacgt caatctecto gaggaactggg gaccctgcac cgaacatgga gagcacaaca
tcaggattcc taggaacctt gctcgtgtta caggcggggt ttttcttgtt gacaagaatc
ctoscaatao cacagagtct agactcgtgg tggacttctc tcaattttct agggggagca
cccacgtgtc ctggccaaaa ttgcagtcce ccaacctoca atcactcace aacctcttgt
cotccaattt gtcttggtta tegtggatg tgtctcgccg gttttatcat attcctcttc
atcctgtctc tatgcctcat cttcttgttg gttttcttgg actacoaggg tatgttgcco
gtttgtctc tacttccagg aacatcaacc accagcacgg gaccatgcaa gacctgcacg
attcctgtct aaggaacctc tatgtttccc tcttgttget gtacaaaacc ttgggacgga
aactgcactt gtattcccat cccatcatcc tgggctttcg caagattcct atggggaggg
gcctcagtcg gtttctcttg gctcagttta ctagtccat ttgttcagtg gttcgtaggg
ctttccccc cgttttgggt ttcaattata tggatgatgt ggtattgggg gccaaagtctg
tacaacatct tgagtccctt ttacctcta ttaccaattt tcttttgtct ttgggtatac
attiga
```

2、按权利要求 1 所述的人乙型肝炎核酸疫苗，其特征在于所述的免疫激活序列 CpG 为人体特异的免疫激活序列，其核苷酸序列为：

```
ggc cgc tgc tgc ttt tgt cgt ttt gtc gtt ttt cgt cgt ttt gtc gtt ttg tgc ttt ttc
gtc gtt ttg acg ttt tga cgt tt
```

3、按权利要求 1 或 2 所述的人乙型肝炎核酸疫苗，其特征在于所述的真核表达载体基本骨架为真核表达载体 pVAX。

4、权利要求 1 或 2 或 3 所述的人乙型肝炎核酸疫苗用以制备预防或治疗乙型肝炎药物之用途。

## 说明书

### 一种人乙型肝炎核酸疫苗

本发明涉及医药生物技术领域，是一种人乙型肝炎核酸疫苗。

乙型肝炎是一种由乙型肝炎病毒（HBV）引起的传染性疾病，是全球特别是发展中国家所面临的重要健康问题。目前对乙型肝炎的治疗策略主要有三个方面：中西药联合保肝治疗，化学合成药（如 LAMIVUDINE 等）抑制肝炎病毒复制，以及细胞因子（如 IFN- $\alpha$  等）保肝及抑制病毒复制联合作用治疗肝炎。但均有不同程度的局限性，导致治疗效果不甚理想。DNA 疫苗的出现为肝炎等一系列感染性疾病的防治提供了新的希望。核酸疫苗具有以下突出优点：（1）能诱发体液及细胞全方位免疫应答，既有预防作用又有治疗作用；（2）能将免疫佐剂 CpG 序列整合入核酸疫苗内，提高机体的免疫应答水平而无需另加佐剂；（3）免疫保护时间长；（4）生产工艺简单、成本低廉、稳定性好且贮运方便。

核酸疫苗的作用机理为：将克隆的乙肝病毒表面抗原（HBsAg）基因重组入真核表达质粒载体，注射于人体肌肉组织，使其在肌细胞中表达病毒表面抗原，经过抗原提呈过程，可激活体内的体液免疫系统和细胞免疫系统。激活的体液免疫系统可产生特异的抗体，消除游离在血液中的病毒，预防乙肝病毒的入侵；而激活的细胞免疫系统可产生细胞毒淋巴细胞（CTL），攻击已被病毒感染的肝细胞，消除隐藏在细胞中的病毒，因此，乙肝核酸疫苗不仅有预防作用而且有治疗作用。

近年来的实验研究表明，细菌 DNA 中的 CpG 序列在诱发机体免疫应答中起着非常重要的作用，可通过对 B 细胞、M $\phi$ 、DC、NK 细胞、T 细胞及造血前体细胞的直接和间接作用产生对机体免疫系统的广泛影响。CpG 免疫激活序列作为一种有效的激发、增强机体免疫应答的佐剂有广阔的应用前景。

虽然已有大量文献报道用乙肝表面抗原基因和 CpG 序列构建核酸疫苗进行乙肝的防治研究，但所用的基因多源于外国常见的 ayw 亚型乙肝病毒，同时 CpG 序列也多为仅可特异刺激小鼠免疫应答的序列，对人的免疫系统却无激活作用。用中国人最常见的 adr 亚型的乙肝病毒表面抗原 PreS2-S 基因及人体特异免疫激活序列构建的乙肝核酸疫苗尚未见文献报道。

本发明的目的是提供一种用中国人最常见的 adr 亚型的乙肝病毒表面抗原 PreS2-S 基因及人体特异免疫激活序列 CpG 构建的乙型肝炎核酸疫苗。

本发明用以构建真核表达载体的基本骨架为 pVAX（购自 Invitrogen 公司，其序列和物理图谱见该公司的产品目录）；构建过程以及制备过程中，质粒扩增所用的宿主菌为 DH10B（购自 GIBCO 公司）；插入的外源基因为：中国人最常见的 adr 亚型的乙肝病毒表面抗原 PreS2-S 基因；插入的 CpG 序列为针对人体的免疫激活序列；其结构分述如下：

#### （1）adr 亚型的乙肝病毒表面抗原 PreS2-S 基因

##### a) 序列特征

长度：846bp

类型：核酸

链数：双链

几何结构：线性

b) 分子类型：DNA

c) 来源：adr 亚型乙肝病毒

d) 序列描述：SEQ ID NO: PreS2-S

```
1 atgcagtgga actccaccac atttcaccaa gtccctgtag atcccagagt gaggggccta
61 tattttcctc ctggtggctc cagttccgga acagtaaacc ctgttgcgac tactgcctca
121 cccatctcgt caatctcctc gaggactggg gaccctgcac cgaacatgga gagcacaaca
181 tcaggattcc taggacctct gctcgtgta caggcggggt tttcttgtt gacaagnatc
241 ctcaoaatao cacagagtct agactcgtgg tggacttctc tcaattttct agggggagca
301 cccacgtgtc ctggccaaaa ttgcagtc ccaacctoca atcaotcacc aacctcttgt
361 cctccaattt gtccctggta tccctggatg tctctcgccg gttttatcat attcctcttc
421 atccctgtgc tatgcctcat ctctctgttg gttctctcgg actaccaagg tatgttgccc
481 gtttgcctc tacttcagg aacatcaacc acoagcacgg gaccatgcan gacctgcacg
541 attcctgtc aaggaacctc tatgttccc tcttgttct gtacaaaacc ttcgagcggg
601 aactgcactt gtattcccat cccatcatcc tgggtttcag caagattcct atgggagggg
661 gctcagtc cgtttctctg gctcagttta ctagtccat ttgttcagt gttcgtaggg
721 ctttccccca ctgtttggt ttoagttata tggatgatgt ggtattgggg gccaaagtctg
781 tacaacatct tgagtccctt ttacctcta ttaccaattt tcttttgtct ttgggtatac
841 atttga
```

(2) 针对人体的免疫激活序列 CpG

a) 序列特征

长度：83bp

类型：核酸

链数：双链

几何结构：线性

b) 分子类型：DNA

c) 来源：人工合成

d) 序列描述：SEQ ID NO: CpG (20062103)

```
ggc cgc tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt ttt cgt cgt ttt gtc gtt ttg tcg ttt ttc
gtc gtt ttg acg ttt tga cgt tt
```

adr 亚型乙肝病毒表面抗原基因克隆方案采用 PCR 的方法进行, 该方法的大致流程为: 根据该基因的两端序列设计 PCR 引物, 然后以 adr 亚型乙肝患者血清中提取的病毒基因组 DNA 为模板, PCR 扩增相应的基因片段, 再将扩增产物克隆测序即可。CpG 序列克隆方案采取人工合成寡核苷酸, 退火后连接、转化后测序。具体方法及其反应体系参见《分子克隆》(科学出版社, 1992 年出版) 相关章节。

#### 附图说明

- 图 1 含 PreS2-S 抗原基因及 CpG 序列的质粒图谱
- 图 2 核酸疫苗 pVAX-PS-CpG 的构建流程图
- 图 3 pVAX-PS-CpG 刺激人外周血淋巴细胞分泌细胞因子比较
- 图 4 小鼠血清 HBsAb 水平的时间曲线
- 图 5 乙肝核酸疫苗接种后小鼠体内血清抗原水平
- 图 6 pVAX-PS-CpG 诱发机体产生的特异性 CTL 反应
- 图 7 pVAX-PS-CpG 在乙肝转基因小鼠和一般小鼠体内诱发抗体效价比较

本核酸疫苗的结构是以真核表达载体——pVAX 为骨架的重组质粒 DNA 分子, 大体结构见图 1。全长约 3.9kb (千碱基对), 除含有质粒复制起始位点 pMB1、卡那霉素抗性基因 Kanamycin 等元件外, 还包含了一个完整的真核转录翻译单元和一组 CpG 序列。真核转录翻译单元含有真核转录翻译所必需的元件: 真核启动子 CMV (即巨细胞病毒启动子)、相应的编码基因及 3' 端的多聚腺苷酸 BGHpA; CpG 序列由两种免疫激活序列组成: 2006 和 2103; 其中 2006 有 2 个拷贝, 其序列为 tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt; 2103 有 1 个拷贝, 其序列为 tcg tcg ttt tga cgt ttt gac gtt。总体上说, 本疫苗是一个可在真核细胞中表达 adr 亚型乙肝病毒表面抗原并可激活人体淋巴细胞的重组质粒 DNA。

本核酸疫苗的构建过程如图 2 所示:

1、构建 pVAX- CpG 载体 用化学合成法合成两条互补的 83mer 寡核苷酸 (内含人特异的 CpG 重复序列), 其序列为:

A 链: 5' ggc cgc tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt ttt cgt cgt ttt gtc gtt ttg  
tcg ttt ttc gtc gtt ttg acg ttt tga cgt tt 3'

B 链: 5' cta gaa acg tca aaa cgt caa aac gac gaa aaa cga caa aac gac aaa acg  
acg aaa aac gac aaa acg aca aaa cga cga gc 3'

将两条互补的 83mer 寡核苷酸于 75℃ 水浴中加热变性 10min, 缓慢退火至室温。退火后的双链短片段 5' 端含 Not I 位点, 3' 端含 Xba I 位点。将此片段与经 Not I/Xba I 双酶切后回收的载体大片段 pVAX1 连接, CaCl<sub>2</sub> 法转化大肠杆菌 DH10B, 具体实施方案为: 先将宿主菌 DH10B 0.5ml 接种于 50ml LB 培养基 (含 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物和 1% 氯化钠, PH7.0) 中, 37℃ 振荡培养 90 分钟至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4 时, 4℃ 5000rpm 离心, 收集宿主菌; 用 40ml 冰预冷的 100mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬, 冰浴 30 分钟; 再以 5000rpm 的转速 4℃ 下离心, 收集宿主菌; 用 1-2ml 冰预冷的 100mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液重悬, 制成感受态细胞备用。取 200μl 感受态细胞与 10μl 连接产物混匀后, 冰浴 30 分钟, 42℃ 热处理 90 秒, 冰浴 2 分钟, 加入 800μl 的 LB (同上), 于 37℃ 培养 1 小时, 取 200μl 转化产物涂

布于含有卡那霉素的 LB 琼脂平板上, 37℃ 培养 12-24 小时, 筛选获得重组质粒 pVAX-CpG 所在的细菌克隆。将该菌株扩增后, 用经典的碱裂解法抽提纯化, 可获得重组质粒 pVAX-CpG。

## 2、构建核酸疫苗质粒 pVAX-PS-CpG

从 adr 亚型大三阳乙肝病人血清中提取病毒基因组 DNA, 取 100μl 血清, 加 5μl 蛋白酶 K 溶液, 其由 0.25% SDS, 5mmol/L EDTA, 10mmol/L Tris-HCl(pH8.0) 配制, 蛋白酶 K 的含量为 20mg/ml; 混匀后置 50℃ 反应 30min; 用等比例的酚和氯仿抽提, 取抽提后的溶液 4μl 为模板, 以引物 1: egg gat cca tgc agt gga act cca cca 和引物 2: egg aat tct caa atg tat acc caa aga 扩增乙肝病毒基因组 DNA, 860bp 的 PCR 扩增产物以 BamH I 和 EcoR I 酶切, 暴露粘性末端。同时以 BamH I/EcoR I 双酶切载体 pVAX -CpG, 电泳回收载体大片段。将以上两段连接后用上述  $\text{CaCl}_2$  法转化大肠杆菌 DH10B, 筛选获得阳性重组子, 即获含有重组质粒 pVAX-PS-CpG 的工程菌。(具体反应体系及实验方案参见前述《分子克隆》相关内容)

## 3、制备核酸疫苗 pVAX-PS-CpG

本发明核酸疫苗是用上述工程菌株制备的。培养扩增及精制可通过常规的细菌培养、质粒扩增和纯化方法进行(详见前述《分子克隆》相关内容)。

培养方式一般为液体培养。少量扩增时可用空气摇床振荡培养; 用于工业性生产时需将细菌发酵罐行高密度悬浮通气培养。对培养基中的培养源无特殊的要求, 一般用 LB 液体培养基, 如需高密度培养, 则可选用 2×YT (含 1.6% 胰蛋白胨、1% 酵母提取物和 0.5% 氯化钠, PH7.0) 或 SOC 液体培养基 (含 2% 胰蛋白胨、0.5% 酵母提取物、0.05% 氯化钠、20mmol/L 葡萄糖、2.5mmol/L KCl、10mmol/L  $\text{MgCl}_2$ , PH7.0)。必要时也可添加动、植、矿物油等作为消泡剂。培养温度一般为 37℃, 培养时间及收集细菌的时机决定于培养基、培养方式以及通气量条件的设置。

从扩增后的工程菌中分离纯化质粒 DNA, 可采用一些常规的方法。例如可用去垢剂 SDS 裂解菌体, 利用质粒 DNA 和染色体 DNA 变复性特征的差异, 通过对 DNA 的变性和复性的处理, 将质粒 DNA 和染色体 DNA 分开; 再利用质粒 DNA 与杂质在溶解度、离子结合力、吸附亲和力和力等方面的区别进行进一步的纯化, 并去除内毒素。具体地说, 存在于复性液中的质粒 DNA 经过脱盐处理后, 可用阴离子交换树脂 (如 DEAE Sepharose) 进行交换, 然后用 TE (含 10mmol/L Tris 和 1mmol/L EDTA) 缓冲液洗脱, 即可制得高纯度的质粒 DNA (具体见实施例)。经分装、冻干, 即可获得半透明片状的本发明核酸疫苗纯品。本品理化性质十分稳定, 可于常温下保存与运输, 使用前, 用注射用水溶解即可。

本核酸疫苗的体外表达及检测, 是将所构建的核酸疫苗通过电穿孔法转染 P815 细胞, 用 G418 筛选获得存活细胞株后, 连续培养一周, 用双抗夹心 ELISA 法检测培养上清及细胞破碎液中 HBsAg 的表达水平, 结果表明均有表达, 说明本发明核酸疫苗可在哺乳动物细胞中表达。

本核酸疫苗中的 CpG 序列对人体淋巴细胞的激活作用, 是在体外用新鲜分离的人外周血淋巴细胞与本核酸疫苗混合培养 24-48 小时后, 定量检测细胞培养上清中的 IL-12 和 IFN- $\gamma$  的水平, 从而反映被人体特异免疫刺激序列激活人淋巴细胞的能力 (见后面的实验 1)。结果如图 3 所示: 整合在本核酸疫苗中的 CpG 序列可有效刺激人淋巴细胞分泌 IL-12 和 IFN- $\gamma$ , 这些细胞因子是激活细胞免疫应答的启动信号, 预示 CpG 序列可作为免疫佐剂有效增强机体的免疫应答水平。

本核酸疫苗的体内表达及检测,是将获得的核酸疫苗纯品免疫小鼠后,用 ELISA 法检测血清中的抗原、抗体水平(见实验 2),结果如图 4、图 5。结果表明本核酸疫苗免疫动物后,不但可表达乙型肝炎的表面抗原,而且可有效诱导体内的体液免疫应答反应;同时,从抗体水平的升高使抗原水平下降,说明抗体能有效中和抗原,具有免疫保护作用。

本核酸疫苗诱发机体产生细胞免疫应答水平的检测,是将获得的核酸疫苗纯品免疫小鼠后,分离小鼠的脾淋巴细胞作为效应细胞,与表达 adr 亚型 HBsAg 的 P815 细胞(靶细胞)混合培养,通过靶细胞被攻击裂解的程度反映细胞免疫应答水平(见实验 3)。同时,为验证本发明的优越性,我们将其与我室构建的、基于相同免疫保护性抗原的其它疫苗,以及市售的亚单位疫苗在细胞免疫应答水平上进行了比较。用于比较的疫苗分别为:不含 CpG 序列的乙肝核酸疫苗(pVAXS2-S)、北京生物制品所和大连制药厂生产的酵母表达亚单位疫苗(YHC、HYC)以及华北制药厂生产的 CHO 表达亚单位疫苗(CHOC),结果见图 6:核酸疫苗激发的 CTL 反应远远高于亚单位疫苗,本发明 pVAX-PS-CpG 激发的 CTL 反应也高于不含 CpG 序列的乙肝核酸疫苗 pVAXS2-S,表明本核酸疫苗的治疗效果优于其他对照组疫苗。

本核酸疫苗打破乙肝转基因小鼠对 HBsAg 免疫耐受的检测,是利用乙肝转基因小鼠对 HBsAg 的免疫耐受模拟慢性乙肝患者对乙肝病毒的低反应性,将获得的核酸疫苗纯品免疫乙肝转基因小鼠,通过小鼠血清抗 HBsAg 抗体的效价反映本核酸疫苗打破免疫耐受的能力,从而体现该疫苗的治疗作用(见实验 4),结果如图 7 所示:接种乙肝疫苗后的第二周转基因小鼠血清中就能检测出特异性抗体。随后几周此抗体水平成直线上升,并于第七周达到峰值。这与非转基因小鼠的血清抗体水平变化基本一致。提示本发明乙肝核酸疫苗能打破 HbsAb 转基因小鼠形成的免疫耐受。

本发明的优点和积极效果:本发明能有效地诱发机体的免疫应答反应,说明其对乙型肝炎病毒携带者、慢性活动性肝炎和慢性迁延性肝炎患者可有一定的治疗作用;且生产工艺简单,成本低廉,理化性质稳定、便于储存和运输。

使用本发明的工程菌制备乙型肝炎核酸疫苗成品的实施例:

从-80℃冰箱中取出冻存的工程菌株——DH10B (pVAX-PS-CpG),于室温融化后,用接种环蘸取少量菌液划线接种于 1.5%的 LB 琼脂平板(含卡那霉素 50ug/ml)上,37℃培养过夜后,取单克隆接种于 50ml LB 液体培养基(含 1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物和 1%氯化钠,卡那霉素 50ug/ml, PH7.0)中,37℃振荡培养 40 小时,作为种子液。按 1:20 的比例将种子液接种于 1 升 SOC 液体培养基中(在前述成分的基础上,另含卡那霉素 50ug/ml),于 37℃剧烈振荡培养 25 小时;加氯霉素至终浓度为 170ug/ml,于 37℃剧烈振荡继续培养 16 小时。将菌液于 4℃以 6000rpm 离心 10 分钟;去上清,将菌体重悬于 30ml 的碱裂解法的溶液 I(含 50mmol/L 葡萄糖、25mmol/L Tris.Cl、10mmol/L EDTA PH8.0)中加溶菌酶 40mg,加 60ml 溶液 II (0.2mol/L NaOH 和 1%SDS),缓慢颠倒 5 次混匀,室温放置 5 分钟。加 45ml 冰预冷的溶液 III(含钾离子 3mol/L、乙酸根 5mol/L),缓慢颠倒数次混匀,冰浴 10 分钟;于 4℃以 10000rpm 离心 10 分钟。取上清,过 500ml G25 柱除盐后,上 20ml DEAE Sepharose 阴离子交换柱,待结合吸附完毕后,按盐离子(Cl<sup>-</sup>)浓度从低到高(0~1mol/L)渐进的梯度洗脱法,用 10 个柱体积的 PBS (PH8.0)和氯化钠溶液缓慢清洗阴离子交换柱,收集 260nm 处吸收峰的洗脱液,得到核酸疫苗的粗品。然后进一步纯化,加 2 倍体积的无水乙醇沉淀,12000rpm 4℃离心 10 分钟,去上清,用 70%的乙醇漂洗凉干后,溶于 PBS (PH8.0)溶液中,即得本发明核酸疫苗的纯品;用紫外分光光度法定量后,再按每份 2mg/ml 分装、冻干制成成品。

本发明治疗乙肝的方案是：用注射用水 1ml 溶解后，肌肉注射即可，剂量为 20ug/kg 体重（也可与局麻药利多卡因 10mg 联合注射，以利疫苗吸收）。二周后追加免疫一次，即可获得较强免疫应答反应。如与亚单位疫苗联合治疗则效果更佳。

#### 实验 1 CpG 序列刺激人体淋巴细胞分泌 IL-12 和 IFN- $\gamma$ 水平检测实验

分离人外周血淋巴细胞，调整细胞浓度至  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ，于 96 孔细胞培养板中每孔中加入 200 $\mu\text{l}$ （约  $2 \times 10^6/\text{孔}$ ），将本发明核酸疫苗 pVAX-PS-CpG 以 30ug/ml 加入孔中，以细菌 DNA 为阳性对照、小牛胸腺 DNA 为阴性对照。37℃ 5%CO<sub>2</sub> 培养 48 小时，取 100  $\mu\text{l}$  细胞培养上清检测 IFN- $\gamma$ 、IL-12。结果如图 3，表明本核酸疫苗中的 CpG 序列作为免疫佐剂可有效刺激人淋巴细胞分泌激活细胞免疫应答的启动信号；IL-12 和 IFN- $\gamma$ ，预示整合于本核酸疫苗中的 CpG 序列可有效增强机体的免疫应答水平。

#### 实验 2 免疫接种后体内的抗原抗体水平检测试验

6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 50 只（平均体重 20g），随机分成三组，第一组 20 只免疫核酸疫苗（每只接种 100 $\mu\text{g}$ ），第二组 20 只免疫亚单位疫苗（每只接种 2 $\mu\text{g}$ ），第三组 10 只为阴性对照。

利用双夹心法检测血清中 HBsAg 及 HBsAb 的水平（试剂盒购自华泰生物工程公司）将标准品 HBsAb 10 倍稀释与待检样品于同一块 96 孔酶联板上包被、显色后，将样品的光密度（OD450）值参照标准品与 OD450 的标准曲线计算得出血清中抗体、抗原的实际效价。

参照检测试剂盒说明，设定 OD450 读取数值  $S/N > 2.1$  为阳性，分析各时间点阳性小鼠与各组总数的百分率。结果表明，免疫后 2~6 周，逐渐检出 HBsAb 阳性小鼠，并于免疫后第 8 周，所有免疫接种小鼠均发生体液免疫应答。见图-4

如图-5 所示，HBsAg 的水平于免疫后第一周达到峰值后随 HBsAb 效价的逐渐升高而逐渐下降，提示核酸疫苗诱发的体液免疫应答反应能有效地中和体内特异抗原，预示将发挥确实的免疫保护作用。

#### 实验 3 本核酸疫苗诱发机体产生细胞免疫应答水平的检测

本实验以乳酸脱氢酶（LDH）释放法检测 CTL 细胞活性。6~8 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 50 只（平均体重 20g），随机分成五组，分别以本核酸疫苗 pVAX-PS-CpG、不含 CpG 序列的乙肝核酸疫苗 pVAXS2-S、北京生物制品所和大连制药厂生产的酵母表达亚单位疫苗（YHC、HYC）以及华北制药厂生产的 CHO 表达亚单位疫苗（CHOc）免疫 BALB/C 小鼠后 12

天，分离小鼠脾淋巴细胞，经计数后加入 ConA（5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ）37℃ 培养 5 天。分别将各组淋巴细胞（效应细胞）加至 96 孔板，细胞浓度  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ，每孔 100 $\mu\text{l}$ ，以不同效靶比加入预先培养的 p815 靶细胞（MHC 限制性与 BALB/C 小鼠一致，转入乙肝 preS/S 抗原基因并稳定表达），效靶细胞共同孵育 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 4 小时，取上清，按试剂盒说明加入 LDH 作用底物，30min 后终止反应，490nm 处读取 OD 值。计算 CTL 细胞杀伤活性，计算公式如下：

$$\text{杀伤活性 (\%)} = [(\text{实验孔 D 值} - \text{自然释放孔 D 值}) / (\text{最大释放孔 D 值} - \text{自然释放孔 D 值})] \times 100\%$$

结果见图 6，表明经免疫接种 12 天后，可在小鼠体内诱发明显的 HBsAg 特异的 CTL 反应，说明肝炎病毒所寄生的宿主细胞将受到 CTL 的靶向性攻击而被清除。提示该疫苗对乙型肝炎病毒携带者、慢性活动性肝炎和慢性迁延性肝炎患者可有一定的治疗作用。



#### 实验4 本核酸疫苗打破乙肝转基因小鼠对 HBsAg 免疫耐受的检测

将乙肝核酸疫苗接种 HBsAg 转基因小鼠 (每只接种 100 $\mu$ g), 每周静脉取血一次, 利用双抗夹心法检测血清中 HBsAb 的水平, 同时以普通 BALB/C 小鼠作为对照。

结果见图 7, 表明接种乙肝疫苗后的第二周转基因小鼠血清中就能检测出特异性抗体。随后几周此抗体水平成直线上升, 并于第七周达到峰值。这与非转基因小鼠的血清抗体水平变化基本一致。提示此乙肝核酸疫苗能打破 HBsAb 转基因小鼠形成的免疫耐受。

根据以上实验可以证明, 本发明核酸疫苗能有效地诱发机体的免疫应答反应, 说明能对乙型肝炎病毒携带者、慢性活动性肝炎和慢性迁延性肝炎患者可有一定的治疗作用。

说明书附图

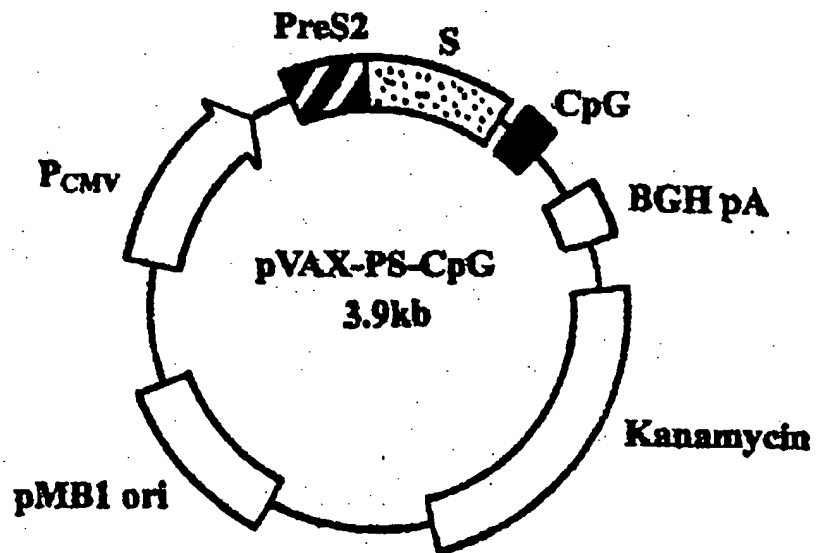


图 1

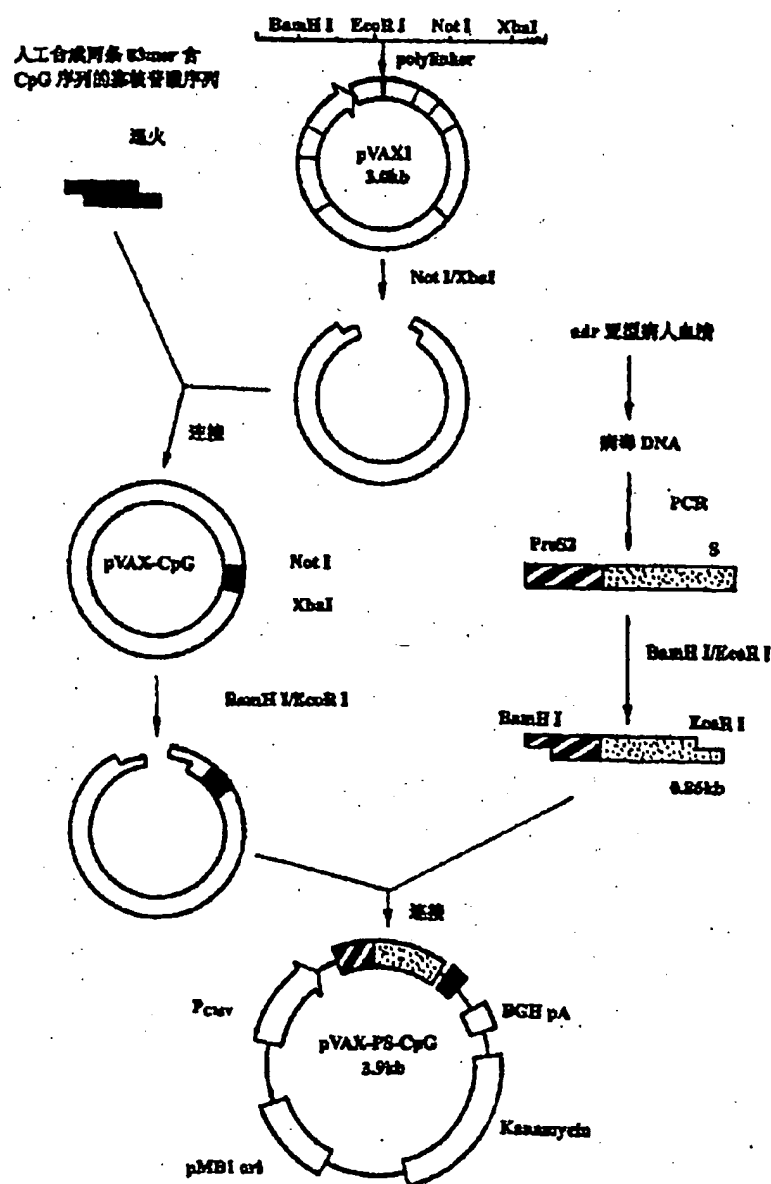


图 2

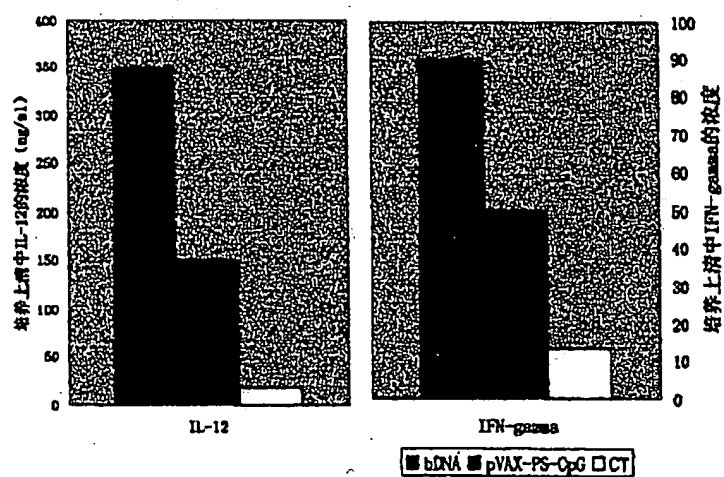


图 3

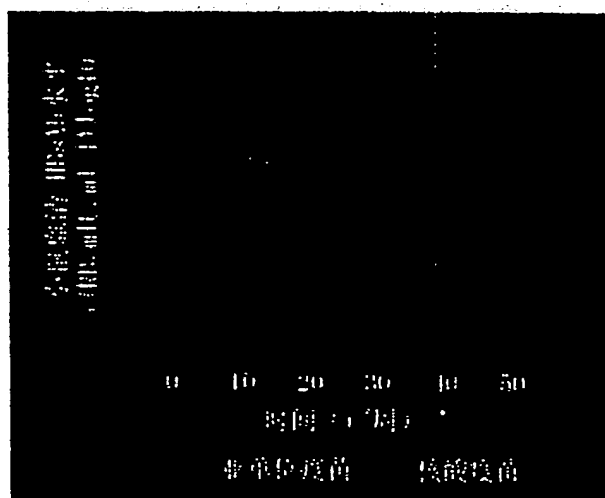


图 4

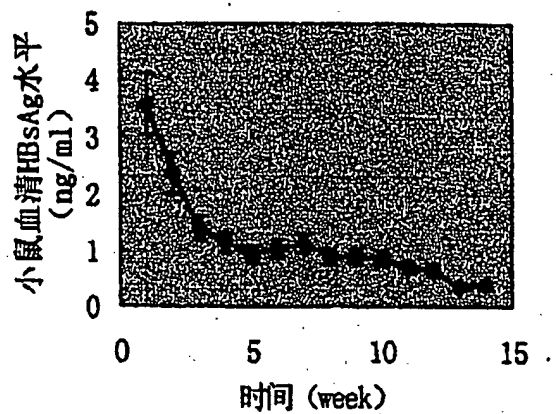


图 5

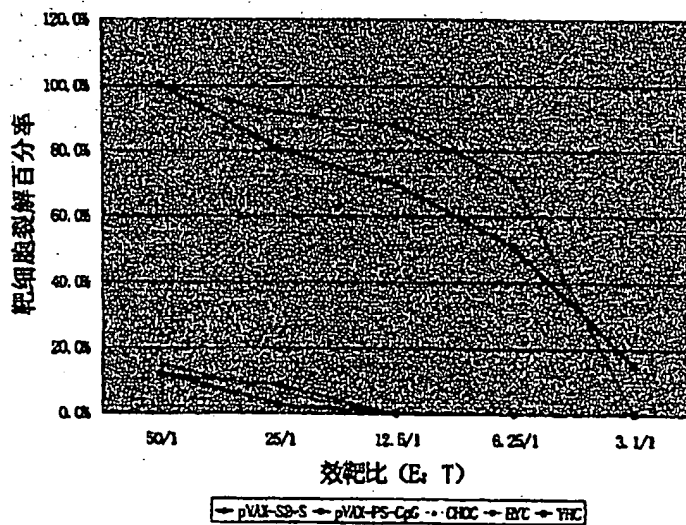
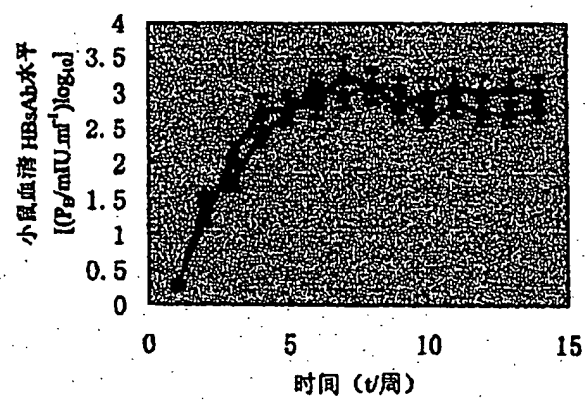


图 6



▲—转基因小鼠组      ●—普通 BALB/C 对照组